(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105823881 A
(43)申请公布日 2016.08.03

(21)申请号 201610329693.8

(22)申请日 2016.05.18

(71)申请人 深圳先进技术研究院
地址 518055 广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号

(72)发明人 王蒲 郑威 卢晓华

(74)专利代理机构 广州三环专利代理有限公司 44202
代理人 郝传鑫 熊永强

(51)Int.Cl.
G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

一种快速检测铅的免疫分析方法与试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种快速检测铅的免疫分析方法，包括：(1)将铅完全抗原包被至固相载体表面，4-6℃包被14-16h，洗涤固相载体，随后加入封闭缓冲液封闭固相载体表面的空白位置，37-40℃封闭1-3h，随后洗涤固相载体；(2)取待测样品和酶标记抗体复合物，加入至步骤(1)获得的固相载体中；37-40℃避光环境中反应30-50min；随后用洗涤缓冲液洗涤固相载体；(3)在步骤(2)得到的固相载体中加入辣根过氧化物酶显色剂进行显色反应并测定光密度值或通过加入辣根过氧化物酶发光剂进行发光反应并测定光信号，根据光密度值或光信号与铅浓度的标准曲线，计算待测样品中铅的含量。本发明提供的方法简便、快速且能够高通量检测。本发明还提供了一种可快速检测铅的试剂盒。

CN 105823881 A

1.一种快速检测铅的免疫分析方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1)取浓度为100-200ng/ml的铅完全抗原，将所述铅完全抗原包被至固相载体表面，4-6℃包被14-16h，洗涤所述固相载体，随后加入封闭缓冲液封闭所述固相载体表面的空白位置，37-40℃封闭1-3h，随后洗涤所述固相载体；

(2)取待测样品和浓度为50-100ng/ml的酶标记抗体复合物，所述待测样品中的铅离子与螯合剂通过化学键连接，加入至步骤(1)获得的固相载体中，轻轻振荡混匀，然后在37-40℃避光环境中反应30-50min；随后用洗涤缓冲液洗涤所述固相载体；所述酶标记抗体复合物为辣根过氧化物酶和单克隆抗体的偶联复合物；

(3)在步骤(2)得到的固相载体中加入辣根过氧化物酶显色剂进行显色反应并测定光密度值或通过加入辣根过氧化物酶发光剂进行发光反应并测定光信号，根据光密度值或光信号与铅浓度的标准曲线，计算所述待测样品中铅的含量。

2.如权利要求1所述的快速检测铅的免疫分析方法，其特征在于，所述铅完全抗原由具有硫氰基的双功能螯合剂连接铅离子与载体蛋白形成，所述双功能螯合剂的一端与所述铅离子通过化学键连接，所述双功能螯合剂的另一端的硫氰基与所述载体蛋白的氨基偶联。

3.如权利要求2所述的快速检测铅的免疫分析方法，其特征在于，所述具有硫氰基的双功能螯合剂为1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸或p-SCN-Bn-DTPA，所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

4.如权利要求1-3任一项所述的快速检测铅的免疫分析方法，其特征在于，步骤(1)中所述铅完全抗原的制备方法为：

将含有铅离子的溶液逐滴加入到所述1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸溶液中，室温下搅拌反应3-5h，超滤除去未反应的1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸和铅离子，重悬后，制得铅离子-双功能螯合剂复合物；

将所述铅离子-双功能螯合剂复合物逐滴加入到含有载体蛋白的缓冲体系中制得反应混合液，室温下反应24-26h，反应结束后离心超滤或透析除去未反应的铅离子和双功能螯合剂，制得铅完全抗原，所述铅完全抗原由具有硫氰基的双功能螯合剂连接铅离子与载体蛋白形成，所述双功能螯合剂的一端与所述铅离子通过化学键连接，所述双功能螯合剂的另一端的硫氰基与所述载体蛋白的氨基偶联。

5.如权利要求1-3任一项所述的快速检测铅的免疫分析方法，其特征在于，步骤(1)中铅完全抗原的制备方法为：

将所述双功能螯合剂p-SCN-Bn-DTPA与所述载体蛋白反应24-26h，反应后超滤除去未反应的p-SCN-Bn-DTPA，重悬后，制得双功能螯合剂-载体蛋白复合物；

在所述双功能螯合剂-载体蛋白复合物中逐滴加入含有铅离子的溶液反应1-3h，超滤去除未螯合的铅离子，制得铅完全抗原，所述铅完全抗原由具有硫氰基的双功能螯合剂连接铅离子与载体蛋白形成，所述双功能螯合剂的一端与所述铅离子通过化学键连接，所述双功能螯合剂的另一端的硫氰基与所述载体蛋白的氨基偶联。

6.如权利要求1所述的快速检测铅的免疫分析方法，其特征在于，所述酶标记抗体复合物的制备方法为：

(1)称取辣根过氧化物酶，溶解制得辣根过氧化物酶溶液；将$NaIO_4$溶液逐滴加入到所述辣根过氧化物酶溶液中，室温避光搅拌30-40min后，透析过夜；

(2)收集透析液，调节所述透析液的pH值至9.0-9.5，然后加入溶有单克隆抗体的碳酸盐缓冲液，室温避光条件下，缓慢搅拌反应2-4h；随后加入$NaBH_4$溶液，充分混匀后，于4℃静置2-4h；透析过夜，纯化后制得所述酶标记抗体复合物。

7.如权利要求1所述的快速检测铅的免疫分析方法，其特征在于，所述辣根过氧化物酶显色剂为3,3',5,5'-四甲基联苯胺，所述辣根过氧化物酶发光剂为3-氨基邻苯二甲酰肼或4-氨基邻苯二甲酰肼。

8.如权利要求1所述的快速检测铅的免疫分析方法，其特征在于，步骤(2)中加入100-200μl浓度为100ng/ml的所述酶标记抗体复合物。

9.如权利要求1所述的快速检测铅的免疫分析方法，其特征在于，在步骤(1)之前，采用棋盘滴定法确定抗原抗体的最佳反应浓度。

10.一种快速检测铅的免疫分析检测试剂盒，其特征在于，包括包被有铅完全抗原的固相载体、铅标准溶液和酶标记抗体复合物、以及包括辣根过氧化物酶显色剂或辣根过氧化物酶发光剂。

一种快速检测铅的免疫分析方法与试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析方法，尤其涉及一种快速检测铅的免疫分析方法与试剂盒。

背景技术

[0002] 铅在自然界中多以硫化物形式存在，是土壤和水体污染中较普遍的元素。铅污染源主要来自汽油里添加抗爆剂—烷基铅，在公路边进行汽车尾气的监测表明，有50％的铅降落在公路两侧数百米范围内，余下的50％则以极细的颗粒飘尘向远处扩散另外。此外铅字印刷厂、金属冶炼、矿山开采、铅蓄电池工业等也是重要的污染源。

[0003] 铅对动物的危害则是慢性累积中毒。人体中铅能与多种酶结合从而干扰有机体多方面的生理活动，对成人神经系统、消化系统及心血管系统造成损害，其中神经系统比其它系统更容易遭受铅毒害。

[0004] 目前，在食品安全检测和环境监测中，重金属铅的检测大都采用仪器法，如原子吸收光谱法、电感耦合等离子体质谱分析法等，以及化学显色法。仪器法，其检测结果精确，但是普遍存在仪器昂贵、对检测样品要求高、需专业技术人员操作和在大量样品检测时耗费时间长等问题。而化学显色法，其灵敏度不够高、较易受样品中其他物质的干扰，在检测大量样品时，存在所需耗材较多和所需时间较长等问题。因此，在突发性食品安全和环境污染问题以及需要大规模食品安全普查和环境状况监测时，需要一种更简便、快速和高通量的检测方法。

发明内容

[0005] 为解决上述问题，本发明提供了一种快速检测铅的免疫分析方法，该方法简便、快速以及能够高通量的检测环境中的铅含量。本发明还提供了一种快速检测铅的免疫分析检测试剂盒。

[0006] 本发明第一方面提供了一种快速检测铅的免疫分析方法，包括以下步骤：

[0007] (1)取浓度为100-200ng/ml的铅完全抗原，将所述铅完全抗原包被至固相载体表面，4-6℃包被14-16h，洗涤所述固相载体，随后加入封闭缓冲液封闭所述固相载体表面的空白位置，37-40℃封闭1-3h，随后洗涤所述固相载体；

[0008] (2)取待测样品和浓度为50-100ng/ml的酶标记抗体复合物，所述待测样品中的铅离子与螯合剂通过化学键连接，加入至步骤(1)获得的固相载体中，轻轻振荡混匀，然后在37-40℃避光环境中反应30-50min；随后用洗涤缓冲液洗涤所述固相载体；所述酶标记抗体复合物为辣根过氧化物酶和单克隆抗体的偶联复合物；

[0009] (3)在步骤(2)得到的固相载体中加入辣根过氧化物酶显色剂进行显色反应并测定光密度值或通过加入辣根过氧化物酶发光剂进行发光反应并测定光信号，根据光密度值或光信号与铅浓度的标准曲线，计算所述待测样品中铅的含量。

[0010] 其中，所述铅完全抗原由具有硫氰基的双功能螯合剂连接铅离子与载体蛋白形成，所述双功能螯合剂的一端与所述铅离子通过化学键连接，所述双功能螯合剂的另一端

的硫氰基与所述载体蛋白的氨基偶联。

[0011] 其中，所述具有硫氰基的双功能螯合剂为1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸或p-SCN-Bn-DTPA，所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

[0012] 其中，步骤(1)中所述铅完全抗原的制备方法为：

[0013] 将含有铅离子的溶液逐滴加入到所述1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸溶液中，室温下搅拌反应3-5h，超滤除去未反应的1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸和铅离子，重悬后，制得铅离子-双功能螯合剂复合物；

[0014] 将所述铅离子-双功能螯合剂复合物逐滴加入到含有载体蛋白的缓冲体系中制得反应混合液，室温下反应24h，反应结束后离心超滤或透析除去未反应的铅离子和双功能螯合剂，制得铅完全抗原，所述铅完全抗原由具有硫氰基的双功能螯合剂连接铅离子与载体蛋白形成，所述双功能螯合剂的一端与所述铅离子通过化学键连接，所述双功能螯合剂的另一端的硫氰基与所述载体蛋白的氨基偶联。其中，步骤(1)中铅完全抗原的制备方法为：

[0015] 将所述双功能螯合剂p-SCN-Bn-DTPA与所述载体蛋白反应24h，反应后超滤除去未反应的p-SCN-Bn-DTPA，重悬后，制得双功能螯合剂-载体蛋白复合物；

[0016] 在所述双功能螯合剂-载体蛋白复合物中逐滴加入含有铅离子的溶液反应1-3h，超滤去除未螯合的铅离子，制得铅完全抗原，所述铅完全抗原由具有硫氰基的双功能螯合剂连接铅离子与载体蛋白形成，所述双功能螯合剂的一端与所述铅离子通过化学键连接，所述双功能螯合剂的另一端的硫氰基与所述载体蛋白的氨基偶联。

[0017] 其中，所述酶标记抗体复合物的制备方法为：

[0018] (1)称取辣根过氧化物酶，溶解制得辣根过氧化物酶溶液；将$NaIO_4$溶液逐滴加入到辣根过氧化物酶溶液中，室温避光搅拌30-40min后，透析过夜；

[0019] (2)收集透析液，调节所述透析液的pH值至9.0-9.5，然后加入溶有单克隆抗体的碳酸盐缓冲液，室温避光条件下，缓慢搅拌反应2-4h；随后加入$NaBH_4$溶液，充分混匀后，于4℃静置2-4h；透析过夜，纯化后制得所述酶标记抗体复合物。

[0020] 其中，所述辣根过氧化物酶显色剂为3,3',5,5'-四甲基联苯胺，所述辣根过氧化物酶发光剂为3-氨基邻苯二甲酰肼或4-氨基邻苯二甲酰肼。

[0021] 其中，步骤(2)中加入100-200μl浓度为100ng/ml的所述酶标记抗体复合物。

[0022] 其中，在步骤(1)之前，采用棋盘滴定法确定抗原抗体的最佳反应浓度。

[0023] 本发明第一方面提供的一种快速检测铅的免疫分析方法，首次通过待测样品与铅完全抗原竞争结合辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体并通过显色反应放大信号实现对待测样品中铅含量的检测，以单克隆抗体为基础建立的免疫分析方法，具有特异性高，稳定性好的特点，本发明实施例提供的检测铅的免疫分析方法为一步法竞争酶联免疫分析方法，简便、快速且能够高通量检测。

[0024] 本发明第二方面提供了一种快速检测铅的免疫分析检测试剂盒，包括：包被有铅完全抗原的固相载体、铅标准溶液和辣根过氧化物酶标记的抗铅的单克隆抗体，以及包括辣根过氧化物酶显色剂或辣根过氧化物酶发光剂。

[0025] 本发明实施例第二方面中所述铅完全抗原、所述固相载体、所述辣根过氧化物酶标记的抗铅的单克隆抗体、所述辣根过氧化物酶显色剂和所述辣根过氧化物酶发光剂均如第一方面所述。

[0026] 本发明第二方面提供的快速检测铅的免疫分析检测试剂盒，能够用于快速检测铅，应用较为简便。

[0027] 综上，本发明有益效果包括以下几个方面：

[0028] 1、本发明提供的一种快速检测铅的免疫分析方法，通过待测样品与铅完全抗原竞争结合辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体并通过显色反应放大信号实现对待测样品中铅含量的检测，方法简便、快速且能够高通量检测待测样品中的铅；

[0029] 2、本发明还提供了一种快速检测铅的免疫分析检测试剂盒，能够用于快速检测铅，应用较为简便。

具体实施方式

[0030] 以下所述是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也视为本发明的保护范围。

[0031] 本发明第一方面提供了一种快速检测铅的免疫分析方法，包括以下步骤：

[0032] (1)取浓度为100-200ng/ml的铅完全抗原，将铅完全抗原包被至固相载体表面，4-6℃包被14-16h，洗涤固相载体，随后加入封闭缓冲液封闭固相载体表面的空白位置，37-40℃封闭1-3h，随后洗涤固相载体；

[0033] (2)取待测样品和浓度为50-100ng/ml的酶标记抗体复合物，待测样品中的铅离子与螯合剂通过化学键连接，加入至步骤(1)获得的固相载体中，轻轻振荡混匀，然后在37-40℃避光环境中反应30-50min；随后用洗涤缓冲液洗涤固相载体；酶标记抗体复合物为辣根过氧化物酶和单克隆抗体的偶联复合物；

[0034] (3)在步骤(2)得到的固相载体中加入辣根过氧化物酶显色剂进行显色反应并测定光密度值或通过加入辣根过氧化物酶发光剂进行发光反应并测定光信号，根据光密度值或光信号与铅浓度的标准曲线，计算待测样品中铅的含量。

[0035] 本发明一实施方式中，在步骤(1)之前，采用棋盘滴定法确定抗原抗体的最佳反应浓度。

[0036] 本发明一实施方式中，棋盘滴定法的操作方法，包括以下步骤：

[0037] (1)用包被缓冲液，将铅完全抗原梯度稀释为2000，1000，500，250，100，50ng/ml，每孔100μL加入到96-微孔板中；该包被缓冲液为浓度为0.05M，pH 9.6的碳酸盐缓冲液；

[0038] (2)将微孔板置于密封袋中，防止孔内液体挥发，4℃包被16h；

[0039] (3)倾去孔内液体，加入PBS-T(PBS-T为浓度为0.015M，pH 7.4的磷酸盐缓冲液，其中含0.05％Tween 20)，放置10s，然后弃板孔液并置于干净的吸水纸上使板孔内液体吸干，重复3次；

[0040] (4)每孔中加入200μL封闭缓冲液，将微孔板密封后，置于37℃封闭1h；

[0041] (5)重复洗板操作(3)；

[0042] (6)取出需要数目的微孔，将梯度稀释的酶标记抗体复合物(浓度分别为1000，500，250，100，50，25，10，5ng/ml)加入到相应地微孔板中，轻轻振荡混匀，密封后置于37℃避光环境中反应30min；

[0043] (7)重复操作(3)；

[0044] (8)依次加入TMB底物显色液A液与底物液B液各50μL于微孔中，振荡混匀，置室温避光环境中反应10min；

[0045] (9)每孔中加入50μL终止液(2M硫酸溶液)，轻轻振荡混匀，设定酶标仪于450nm处测定每孔OD值，根据每孔OD值，确定抗原抗体的最佳反应浓度。

[0046] 本发明一实施方式中，铅完全抗原由具有硫氰基的双功能螯合剂连接铅离子与载体蛋白形成，双功能螯合剂的一端与铅离子通过化学键连接，双功能螯合剂的另一端的硫氰基与载体蛋白的氨基偶联。

[0047] 本发明一实施方式中，具有硫氰基的双功能螯合剂为1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸(iEDTA)或p-SCN-Bn-DTPA，载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA)或卵清蛋白(OVA)。

[0048] 本发明一实施方式中，步骤(1)中铅完全抗原的制备方法为：

[0049] 将含有铅离子的溶液逐滴加入到1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸溶液中，室温下搅拌反应3-5h，超滤除去未反应的1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸和铅离子，重悬后，制得铅离子-双功能螯合剂复合物；

[0050] 将铅离子-双功能螯合剂复合物逐滴加入到含有载体蛋白的缓冲体系中制得反应混合液，室温下反应24-26h，反应结束后离心超滤或透析除去未反应的铅离子和双功能螯合剂，制得铅完全抗原，铅完全抗原由具有硫氰基的双功能螯合剂连接铅离子与载体蛋白形成，双功能螯合剂的一端与铅离子通过化学键连接，双功能螯合剂的另一端的硫氰基与载体蛋白的氨基偶联。

[0051] 本发明一优选实施方式中，铅离子与1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸(iEDTA)的摩尔比为1:1。

[0052] 本发明一优选实施方式中，1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸溶液为将1-(4-异硫氰苄基)乙烯基二胺-N,N,N,N-四乙酸溶解在二甲基亚砜中制得。

[0053] 本发明一优选实施方式中，搅拌速度为125rpm。

[0054] 本发明一优选实施方式中，加入三乙胺溶液，调节反应混合液的pH为9.0-9.5。

[0055] 本发明一优选实施方式中，含有载体蛋白的缓冲体系为载体蛋白溶解于pH值为7.4的Tris-HCl缓冲液中制得，Tris-HCl缓冲液的摩尔浓度为0.1mol/L。

[0056] 本发明一优选实施方式中，牛血清白蛋白与铅离子的摩尔比为1:44-50。

[0057] 本发明一优选实施方式中，卵清蛋白与铅离子的摩尔比为1:17-20。

[0058] 本发明一实施方式中，步骤(1)中铅完全抗原的制备方法为：

[0059] 将双功能螯合剂p-SCN-Bn-DTPA与载体蛋白反应24-26h，反应后超滤除去未反应的p-SCN-Bn-DTPA，重悬后，制得双功能螯合剂-载体蛋白复合物；

[0060] 在双功能螯合剂-载体蛋白复合物中逐滴加入含有铅离子的溶液反应1-3h，超滤去除未螯合的铅离子，制得铅完全抗原，铅完全抗原由具有硫氰基的双功能螯合剂连接铅离子与载体蛋白形成，双功能螯合剂的一端与铅离子通过化学键连接，双功能螯合剂的另一端的硫氰基与载体蛋白的氨基偶联。

[0061] 本发明一优选实施方式中，将双功能螯合剂p-SCN-Bn-DTPA与载体蛋白在缓冲体系中反应，缓冲体系为pH值为9.4的HEPES缓冲液。

[0062] 本发明一优选实施方式中，超滤条件为4℃且6000r/min。

[0063] 本发明一优选实施方式中，载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

[0064] 本发明一优选实施方式中，牛血清白蛋白与铅离子的摩尔比为1:44-50。

[0065] 本发明一优选实施方式中，卵清蛋白与铅离子的摩尔比为1:17-20。

[0066] 本发明一优选实施方式中，双功能螯合剂p-SCN-Bn-DTPA和卵清蛋白的质量比为1:3-4。

[0067] 本发明一优选实施方式中，固相载体为聚苯乙烯酶标板、聚苯乙烯珠、尼龙膜、聚偏氟乙烯膜、硝酸纤维素膜或磁性微珠。

[0068] 本发明一优选实施方式中，步骤(1)中的封闭缓冲液为含有质量浓度为3％的小牛血清白蛋白或质量浓度为5％的脱脂奶粉，封闭缓冲液的pH值为7.4。

[0069] 本发明一优选实施方式中，步骤(1)中洗涤缓冲液为浓度为0.015M且pH值为7.4的磷酸盐缓冲液，该磷酸盐缓冲液中还含有质量浓度为0.05％的吐温20。

[0070] 本发明一优选实施方式中，待测样品为含有铅离子的环境样品。

[0071] 本发明一优选实施方式中，将环境样品进行常规的预处理，然后加入EDTA螯合形成Pb^{2+}-EDTA，将该待测样品进行免疫分析以检测待测样品中的铅含量。

[0072] 本发明一优选实施方式中，步骤(1)中铅完全抗原的制备方法为：

[0073] 称取0.5mg iEDTA，用100μLDMSO溶解；随后将100μL含有1.0μM Pb^{2+}的溶液逐滴加入到iEDTA溶液中，25℃、125rpm反应3h，形成金属-螯合剂复合物；然后将金属-螯合剂复合物逐滴加入到5mg OVA溶液(用800μL，0.1M，pH7.4Tris-HCl缓冲液)中，加入三乙胺溶液，调节反应混合液的pH为9.0-9.5；25℃、125rpm反应24h；反应结束后，用反应液加入到已经用0.1M EDTA·2Na预处理的超滤管中，5000g离心超滤5次，每次10min，除去未偶联上的金属和螯合剂；最后用PBS缓冲液重悬截留物，得到总体积为1mL的抗原溶液，经鉴定后分装，置于-20℃保存备用。

[0074] 本发明一优选实施方式中，加入100-200μl浓度为100ng/ml的酶标记抗体复合物。

[0075] 本发明一优选实施方式中，单克隆抗体为小鼠制备的抗Pb^{2+}-EDTA的单克隆抗体4B7。

[0076] 本发明一优选实施方式中，酶标记抗体复合物的制备方法为：

[0077] (1)称取辣根过氧化物酶，溶解制得辣根过氧化物酶溶液；将$NaIO_4$溶液逐滴加入到辣根过氧化物酶溶液中，室温避光搅拌30-40min后，透析过夜；

[0078] (2)收集透析液，调节透析液的pH值至9.0-9.5，然后加入溶有单克隆抗体的碳酸盐缓冲液，室温避光条件下，缓慢搅拌反应2-4h；随后加入$NaBH_4$溶液，充分混匀后，于4℃静置2-4h；透析过夜，纯化后制得酶标记抗体复合物。

[0079] 本发明一优选实施方式中，上述步骤(2)纯化的步骤为：收集透析液，置于4℃层析柜中，在搅拌状态下，逐滴加入等体积的饱和硫酸铵溶液，混匀后，静置过夜；4℃，7500rpm离心30min后，弃上层清液，用磷酸盐缓冲液重悬沉淀；将重悬后的溶液装入透析袋，用磷酸盐缓冲液，4℃透析，以去除小分子物质，将收集的透析液于4℃，10000rpm离心30min后，收集上层清液即为酶标记抗体复合物。

[0080] 本发明一实施方式中，步骤(5)中，辣根过氧化物酶显色剂为3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)，辣根过氧化物酶发光剂为3-氨基邻苯二甲酰肼或4-氨基邻苯二甲酰肼。显色反应为先加入辣根过氧化物酶显色剂再加入终止液终止显色，随后用酶标仪测定光密度。发

光反应为先加入辣根过氧化物酶发光剂再加入终止液终止发光，随后用荧光检测仪测定发光强度。

[0081] 本发明一优选实施方式中，对TMB的来源不做特殊限定，可购买得到。

[0082] 本发明一优选实施方式中，标准曲线的制作方法和本发明第一方面提供的检测铅的免疫分析方法相同，区别仅在于步骤(2)中在固相载体加入按浓度梯度稀释的铅标准溶液而不是待测样品；根据铅标准溶液的浓度和光密度值或光信号的线性关系，绘制标准曲线。

[0083] 本发明一优选实施方式中，铅标准溶液为铅离子-螯合剂复合物(Pb^{2+}-EDTA)。

[0084] 本发明一优选实施方式中，铅标准溶液的浓度梯度为200,100,50,25,10,5,2.5,1,0ng/ml。

[0085] 本发明一实施方式中，碳酸盐缓冲液的浓度为0.05M且pH值为9.6，洗涤缓冲液含有浓度为0.015M且pH值为7.4的磷酸盐缓冲液和质量浓度为0.05％的吐温20，稀释缓冲液为pH值为7.4的磷酸盐缓冲液。

[0086] 本发明第一方面提供的本发明实施例提供了一种检测铅的免疫分析方法，通过待测样品与铅完全抗原竞争结合辣根过氧化物酶标记的抗铅的单克隆抗体并通过显色反应放大信号实现对待测样品中铅含量的检测。本发明实施例提供的一种检测铅的免疫分析方法为一步法竞争酶联免疫分析方法，简便、快速且能够高通量检测。

[0087] 本发明第二方面提供了一种快速检测铅的免疫分析检测试剂盒，包括：包被有铅完全抗原的固相载体、铅标准溶液和辣根过氧化物酶标记的抗铅的单克隆抗体，以及包括辣根过氧化物酶显色剂或辣根过氧化物酶发光剂。

[0088] 本发明实施例第二方面中铅完全抗原、固相载体、辣根过氧化物酶标记的抗铅的单克隆抗体、辣根过氧化物酶显色剂和辣根过氧化物酶发光剂均如第一方面。

[0089] 本发明一优选实施方式中，铅标准溶液为铅离子-螯合剂复合物(Pb^{2+}-EDTA)。

[0090] 本发明第二方面提供的快速检测铅的免疫分析检测试剂盒，能够用于快速检测铅，应用较为简便。

[0091] 实施例一

[0092] 一种铅完全抗原的制备方法，包括以下步骤：

[0093] 称取0.5mg iEDTA，用100μL DMSO溶解，制得iEDTA溶液；随后将100μL含有1.0μmol Pb^{2+}的溶液逐滴加入到iEDTA溶液中，25℃、125rpm反应3h，制得Pb^{2+}-iEDTA复合物。将1.5mg BSA溶解于800μL，0.1M，pH值为7.4Tris-HCl缓冲液中制得含有BSA的缓冲体系；然后将Pb^{2+}-iEDTA复合物逐滴加入到含有BSA的缓冲体系中制得反应混合液；加入三乙胺溶液调节反应混合液的pH值为9.0，25℃、125rpm反应24h；反应结束后，用反应混合液加入到已经用0.1M EDTA·2Na预处理的超滤管中，5000g离心超滤5次，每次10min，除去未偶联上的Pb^{2+}和iEDTA。收集离心超滤的截留物即为铅完全抗原。最后可用PBS缓冲液重悬截留物，得到总体积为1mL的铅完全抗原溶液。铅完全抗原溶液可经鉴定后分装，置于-20℃保存备用。

[0094] 实施例二

[0095] 一种铅完全抗原的制备方法，包括以下步骤：

[0096] 称取0.5mg iEDTA，用100μL DMSO溶解，制得iEDTA溶液；随后将100μL含有1.0μmol Pb^{2+}的溶液逐滴加入到iEDTA溶液中，25℃、125rpm反应3h，制得Pb^{2+}-iEDTA复合物。将5mg

OVA溶解于800μL，0.1M，pH值为7.4Tris-HCl缓冲液中制得含有BSA的缓冲体系；然后将Pb^{2+}-iEDTA复合物逐滴加入到含有OVA的缓冲体系中制得反应混合液；加入三乙胺溶液调节反应混合液的pH值为9.0，25℃、125rpm反应24h；反应结束后，用反应液加入到已经用0.1M EDTA·2Na预处理的超滤管中，5000g离心超滤5次，每次10min，除去未偶联上的Pb^{2+}和iEDTA；收集离心超滤的截留物即为铅完全抗原；最后可用PBS缓冲液重悬截留物，得到总体积为1mL的铅完全抗原溶液；铅完全抗原溶液可经鉴定后分装，置于-20℃保存备用。

[0097] 实施例三

[0098] 一种铅完全抗原的制备方法，包括以下步骤：

[0099] 先将2mg的p-SCN-Bn-DTPA和4.0mg的BSA蛋白在pH值为9.4的HEPES缓冲液中反应24h后，在4℃、6000r/min的条件下，超滤5min去除未偶联上的p-SCN-Bn-DTPA，再用pH值为7.4的HEPES缓冲液洗取截留物，然后逐滴加入100μL含有3.0μmol Pb^{2+}的溶液，室温反应1h后，超滤去除未螯合的Pb^{2+}；收集超滤的截留物即为铅完全抗原；可再用反应缓冲液稀释截留物，最终得到2mL的溶液。使用前，用100mmol/L DTPA和0.1mol/L，pH7.4的HEPES缓冲液对超滤离心管预处理。

[0100] 实施例四

[0101] 一种铅完全抗原的制备方法，包括以下步骤：

[0102] 先将2mg的p-SCN-Bn-DTPA和6.5mg的OVA蛋白在pH值为9.4的HEPES缓冲液中反应24h后，在4℃、6000r/min的条件下，超滤5min去除未偶联上的p-SCN-Bn-DTPA，再用pH值为7.4的HEPES缓冲液洗取截留物，然后逐滴加入100μL含有3.0μmol Pb^{2+}的溶液，室温反应1h后，超滤去除未螯合的Pb^{2+}；收集超滤的截留物即为铅完全抗原；可再用反应缓冲液稀释截留物，最终得到2mL的溶液；使用前，用100mmol/L DTPA和0.1mol/L，pH7.4的HEPES缓冲液对超滤离心管预处理。

[0103] 实施例五

[0104] 一种酶标记抗体复合物的制备方法，包括以下步骤：

[0105] (1)称取2mg辣根过氧化物酶，溶解于1mL去离子水中制得辣根过氧化物酶溶液；将200μL 0.1M $NaIO_4$溶液(现配)逐滴加入到辣根过氧化物酶溶液中，室温避光搅拌30min得到反应液；随后将反应液装入透析袋中，用1mM，pH值为4.4醋酸钠缓冲液在4℃条件下透析过夜；

[0106] (2)收集透析袋中的透析液，用0.05M，pH值为9.6的碳酸盐缓冲液调节透析液的pH值至9.0-9.5，然后立即加入1mL溶有50μg抗铅的单克隆抗体的碳酸盐缓冲液，室温避光条件下，缓慢搅拌反应2h；随后加入100μL，4mg/mL $NaBH_4$溶液(现配)，充分混匀后，于4℃静置2h；然后将反应液装入透析袋中，用0.015M pH值为7.4的磷酸盐缓冲液在4℃条件下透析过夜；

[0107] (3)收集透析液，置于4℃层析柜中，在搅拌状态下，逐滴加入等体积的饱和硫酸铵溶液，混匀后，静置过夜；4℃，7500rpm离心30min后，弃上层清液，用磷酸盐缓冲液重悬沉淀；将重悬后的溶液装入透析袋，用磷酸盐缓冲液，4℃透析，以去除小分子物质，将收集的透析液于4℃，10000rpm离心30min后，收集上层清液，制得酶标记抗体复合物。经鉴定后分装，置于-20℃保存。

[0108] 实施例六

[0109] 一种快速检测铅的免疫分析方法，包括以下步骤：

[0110] (一)、棋盘滴定确定抗原抗体的最佳反应浓度

[0111] (1)用包被缓冲液(0.05M，pH 9.6碳酸盐缓冲液)将检测抗原梯度稀释(2000，1000，500，250，100，50ng/ml)，每孔100μL加入到96-微孔板中；

[0112] (2)将板置于密封袋中，防止孔内液体挥发，4℃包被16h；

[0113] (3)倾去孔内液体，加入PBS-T(0.015M，pH 7.4磷酸盐缓冲液，含0.05％Tween 20)，放置10s，然后弃板孔液并置于干净的吸水纸上使板孔内液体吸干，重复3次；

[0114] (4)每孔中加入200μL封闭缓冲液(5％脱脂奶粉)，将板密封后，置于37℃封闭1h；

[0115] (5)重复洗板操作(3)；

[0116] (6)取出需要数目的微孔，将梯度稀释的纯化辣根过氧化物酶和单克隆抗体偶联复合物(1000，500，250，100，50，25，10，5ng)加入到相应地微孔板中，轻轻振荡混匀，密封后置于37℃避光环境中反应30min；

[0117] (7)重复操作(3)；

[0118] (8)依次加入TMB底物显色液A液与底物液B液各50μL于微孔中，振荡混匀，置室温避光环境中反应10min；

[0119] (9)每孔中加入50μL终止液(2M硫酸溶液)，轻轻振荡混匀，设定酶标仪于450nm处测定每孔OD值。

[0120] (二)、快速检测铅的免疫分析方法

[0121] (1)用包被缓冲液(0.05M，pH 9.6碳酸盐缓冲液)将最佳浓度的检测抗原稀释(200ng/ml)，每孔100μL加入到96-微孔板中；

[0122] (2)将板置于密封袋中，防止孔内液体挥发，4℃包被16h；

[0123] (3)倾去孔内液体，加入PBS-T(0.015M，pH 7.4磷酸盐缓冲液，含0.05％Tween 20)，放置10s，然后弃板孔液并置于干净的吸水纸上使板孔内液体吸干，重复3次；

[0124] (4)每孔中加入200μL封闭缓冲液(5％脱脂奶粉)，将板密封后，置于37℃封闭1h；

[0125] (5)重复洗板操作(3)；

[0126] (6)取出需要数目的微孔，将梯度稀释的小分子抗原标准品(Pb^{2+}-EDTA，200，100，50，25，10，5，2.5，1，0ng)加入到相应地微孔板中，同时将样品加入到样品微孔板中，再往标准品和样品微孔板中均加入100μl辣根过氧化物酶和单克隆抗体偶联复合物(100ng/ml)轻轻振荡混匀，密封后置于37℃避光环境中反应30min；

[0127] (7)重复操作(3)；

[0128] (8)依次加入TMB底物显色液A液与底物液B液各50μL于微孔中，振荡混匀，置室温避光环境中反应10min；

[0129] (9)每孔中加入50μL终止液(2M硫酸溶液)，轻轻振荡混匀，设定酶标仪于450nm处测定每孔OD值。

[0130] (10)通过测得的OD值，绘制标准曲线，通过标准曲线计算样品中重金属铅的浓度。

[0131] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

专利名称(译)	一种快速检测铅的免疫分析方法与试剂盒		
公开(公告)号	CN105823881A	公开(公告)日	2016-08-03
申请号	CN201610329693.8	申请日	2016-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	深圳先进技术研究院		
申请(专利权)人(译)	深圳先进技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	深圳先进技术研究院		
[标]发明人	王蒲 郑威 卢晓华		
发明人	王蒲 郑威 卢晓华		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
代理人(译)	熊永强		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种快速检测铅的免疫分析方法，包括：(1)将铅完全抗原包被至固相载体表面，4-6℃包被14-16h，洗涤固相载体，随后加入封闭缓冲液封闭固相载体表面的空白位置，37-40℃封闭1-3h，随后洗涤固相载体；(2)取待测样品和酶标记抗体复合物，加入至步骤(1)获得的固相载体中；37-40℃避光环境中反应30-50min；随后用洗涤缓冲液洗涤固相载体；(3)在步骤(2)得到的固相载体中加入辣根过氧化物酶显色剂进行显色反应并测定光密度值或通过加入辣根过氧化物酶发光剂进行发光反应并测定光信号，根据光密度值或光信号与铅浓度的标准曲线，计算待测样品中铅的含量。本发明提供的方法简便、快速且能够高通量检测。本发明还提供了一种可快速检测铅的试剂盒。